

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—151358

① Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和56年(1981)11月24日

G 01 N 33/66

6422—2G

C 12 Q 1/28

7349—4B

発明の数 2

審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑭ レドックス反応を検出する方法及び診断剤

① 特 願 昭56—45679

② 出 願 昭56(1981)3月30日

優先権主張 ③ 1980年3月29日 ④ 西ドイツ
(DE) ⑤ P 3012368.3

⑦ 発 明 者 ラスツロ・ケーファアー
ドイツ連邦共和国マンハイム31
ランペルトハイマー・シュトラ
ーセ107-A

⑧ 発 明 者 ヴアルター・リッターズドルフ
ドイツ連邦共和国マンハイム31

⑥ 発 明 者 カツセラー・シュトラッセ6
ヴオルフガング・ヴェルナー
ドイツ連邦共和国マンハイム31
マイセナー・ヴェーク39
⑩ 出 願 人 ベーリングガー・マンハイム・ゲ
ゼルシャフト・ミット・ベシユ
レンクテル・ハフツング
ドイツ連邦共和国マンハイム—
ヴァルトホーフ・ザントホーフ
エル・ストラッセ112-132
⑪ 復 代 理 人 弁理士 矢野敏雄

明 細 書

1 発明の名称

レドックス反応を検出する方法及び診断剤

2 特許請求の範囲

1. レドックス試薬系を試験系に装入することによりレドックス反応を検出する方法において、付加的に試験系中で可溶性の沃素酸塩を、試験系に存在する最高量の妨害的な還元剤に対して過剰量に相当する量で添加することを特徴とするレドックス反応を検出する方法。
2. レドックス試薬系及び沃素酸塩を別々に試験系に加える特許請求の範囲第1項記載の方法。
3. 沃素酸塩をレドックス試薬系の前に加える特許請求の範囲第2項記載の方法。
4. レドックス試薬系及び沃素酸塩を一括に試験系に加える特許請求の範囲第1項記載の方法。
5. 試験系のpH値をレドックス試薬系の添加により高める特許請求の範囲第1項～第3項

いずれか1つに記載の方法。

6. pH値を5～6から7～9に高める特許請求の範囲第5項記載の方法。
7. レドックス試薬系を含有するレドックス反応を検出するための診断剤において、付加的に試験系で可溶性の沃素酸塩を、試験系に存在する最高量の妨害的な還元剤に対して過剰量に相当する量で含有するレドックス反応を検出するための診断剤。
8. 試験系100ml当たり沃素酸塩0.5～2gを含有する特許請求の範囲第7項記載の診断剤。
9. 試験系と一緒にpH値5～9が調節される特許請求の範囲第7項又は第8項記載の診断剤。
10. レドックス試薬系が酸化指示薬、ヒドロペルオキシド、ペルオキシダーゼ及び常用の助剤から成る特許請求の範囲第7項～第9項いずれか1つに記載の診断剤。
11. レドックス試薬系が還元指示薬、還元剤並びに場合により電子伝達剤から成る特許請求

の範囲第7項～第9項いずれか1つに記載の診断剤。

12. 試験系で不溶の吸収性担体上に存在するか又は場合により硬質担体上に施された、試験系で膨潤性のフィルム中に包含されている特許請求の範囲第7項～第11項いずれか1つに記載の診断剤。

13. 溶液、凍結乾燥体又は可溶性試薬錠剤として存在するか又は硬質担体上又はその中に存在する、試験系に可溶性のフィルム中に包含されている特許請求の範囲第7項～第11項いずれか1つに記載の診断剤。

3 発明の詳細な説明

本発明は、還元剤、特にアスコルビン酸による妨害を回避するために沃素、酸塩を含有するレドックス反応に基づく方法及び診断剤に関する。臨床及び製薬化学、生化学並びに食品化学では基質及び酵素の測定法にとつてレドックス系は非常に重要である。そのような測定法には種々の測定法がある。しかし所謂迅速診断剤が特

剤も同様にアスコルビン酸の存在において偽陰性で反応することが知られている。この場合、アスコルビン酸はヘモグロビン接触酸化により形成される色素を還元すると思われる。

アスコルビン酸による偽陽性所見の例としては、テトラゾリウム塩の有色ホルマゼへの還元を適用するNADH又はNADPHの測定が挙げられる。この場合にはアスコルビン酸は同様に作用しかつ測定信号を高める。

それ故、還元剤、特にアスコルビン酸による妨害が特に重大でありかつ広範囲であるために、これを試験液から除去するかもしくはこれが妨害しない方法又は製剤を開示する実験が多くなされた。

次の方法が公知になつた：

- 沃素溶液で酸化しかつ過剰の沃素をチオサルフェートで除去する
- 酸化マンガンで酸化しかつ未使用の酸化剤を分別する
- アルカリ性 H_2O_2 で酸化する

に重要である。それは、すべての試薬が吸収性担体中に又はフィルム中に乾燥形で存在する製剤である。この製剤を試験液と接触させ、発生する色を視覚的に又は反射光度計により判定することができる。

しばしば、前記の化学分析の分野において試験すべき物質、例えば尿、血液、食品、医薬調剤等は多かれ少なかれ多量の還元剤を含有するのが特徴的である。最も頻繁なのがアスコルビン酸である。レドックス反応がアスコルビン酸のような強力な還元剤に敏感でそれにより妨害され得ることは明らかである。グルコースをGOD-POD-レドックス指示薬の反応に基づいて迅速診断剤を用いて検出する際アスコルビン酸により偽陰性の所見が起ることは公知である。グルコースからGOD(グルコースオキシダーゼ)により生じた H_2O_2 がPOD(ペルオキシダーゼ)と、指示薬の代りにアスコルビン酸に対して酸化下に作用して、測定は抑制される。

更に、尿中の血液を検出するための迅速診断

—試料溶液をアニオン交換体で処理する。

これらの方法のすべては試料溶液の煩雑な処理を必要とする。更に、特に迅速診断剤では完全な課題解決には非常に経費がかかる。まず初めに尿をアニオン交換体含有区域を通してクロマトグラフィー処理して(西ドイツ国特許公告第1598008号明細書)、その後で更に処理する際に固有の試薬区域上で妨害を受けずに反応させることのできる試験紙も公知である。イオン交換体区域を有する試験材はグルコース及びガラクトースに関しては市販されている。それは煩雑な構造を有しかつ必要なクロマトグラフィー処理時間により分析時間は従来の迅速試験に比較して著しく高まる。

液体からアスコルビン酸を除去もしくは診断剤の妨害を除去するための他の可能性は光学的試験剤及び迅速診断剤中にアスコルビン酸オキシダーゼを添加することを基本とする(西ドイツ国特許公告第2625834号明細書)。

この方法は特にアスコルビン酸の濃度が低い

場合に有用であるが、全体的には次の理由から課題を解決したとは認められない：

—アスコルビン酸オキシダーゼはアスコルビン酸とだけ反応し、グルクロニド及びサルフェートのような代謝物質並びに他の還元剤とは反応しない。

—アスコルビン酸のアスコルビン酸オキシダーゼによる酸化は比較的緩慢であるので、アスコルビン酸を100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ より多量に含有し得る試験液では至当な程度で確実に妨害を除去するためには不経済に多量のアスコルビン酸オキシダーゼを使用しなければならない。

—特定の場合には酵素のアスコルビン酸オキシダーゼは作用性試薬により比較的迅速に破壊される。それ故例えば尿—血液—試験で使用されるクモールヒドロペルオキシドをマイクロカプセル中に封入しなければならない(米特許第4129417号明細書)。

ステリンオキシダーゼ、グリセリンオキシダーゼ、ウリカーゼ等

—指示薬：ベンジン誘導体(オトリジン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジン)、ヘテロ環式アジン(アジノービス—ベンゾ—チアゾロン—スルホン酸)、テトラゾリウム塩の還元生成物としてのホルマジン等

—ペルオキシダーゼ：西洋ワサビオキシダーゼ、ヘモグロビン(血液)

—助剤：酸化指示薬の安定剤として記載されているアリールセミカルバジド(西ドイツ国特許公開第2716060号明細書)。

沃素酸塩のこの特性が驚異的でありかつ酸化電位からは推定することができないことは他のハロゲン化合物との比較が明らかにする。それらの標準電位はコットン・ウィルキンソン[Cotton-Wilkinson 共著, "Anorganische Chemi-

ところで、公知の処方に又は試験すべき試験系に付加的に沃素酸塩を添加する場合に、例えばアスコルビン酸及びその代謝物質が比較的多量に存在していてもそれらから妨害されない方法及び診断剤、特に迅速診断剤を開示できることが意外にも判明した。沃素酸塩がアスコルビン酸を極めて迅速に酸化するが、臨床化学で重要な基質、更に分析学で常用の多くのレドックス指示薬及びそれらのその都度の呈色反応生成物並びに常用の助剤を酸化しないということは意外であると思わなければならない。それ故、例えば常用の分析条件(pH 5~9)下にかつ常用の分析時間内に次のものが沃素酸塩の作用を受けない：

—基質：炭水化物(グルコース、ガラクトース等)、コレステリン、グリセリン(トリグリセリドから)、尿酸、NADH及びNADHP等

—基質オキシダーゼ：グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、コレ

ステリンオキシダーゼ、グリセリンオキシダーゼ、ウリカーゼ等
により次の通りである：

沃素酸塩	+ 0.26 v
過沃素酸塩	+ 0.39 v
沃素	+ 0.54 v
臭素酸塩	+ 0.61 v
塩素酸塩	+ 0.63 v。

過沃素酸塩及び遊離沃素はアスコルビン酸とならんで多くの指示薬、殊にベンジン誘導体を酸化するが、臭素酸塩及び塩素酸塩は酸化電位が高いにもかかわらずアスコルビン酸を酸化する状態にはなく、従つて所望の目的には完全に不適当である。沃素酸塩についてもそれはアスコルビン酸を酢酸溶液中でしか酸化しないと見なされていた[R. Indovina, D. Elia 著, "Boll. Soc. Ital. Biol. sperm.", 20巻, 390~393頁(1945年), "C.A.", 40巻, 6110頁(1946年)]。

実際にアスコルビン酸により妨害されない本発明による迅速診断剤は、公知の試験法の処方

に沃素酸塩を混合することにより簡単に製造することができる。そのような試験法は例えば次のものである：

—有機ヒドロペルオキシド及びオートリジン（西ドイツ国特許公開第2235152号明細書、同第2640211号明細書、同1242905号明細書）並びにテトラメチルベンジジン（西ドイツ国特許公開第2460903号明細書、同第2716060号明細書）を含有する、尿中血液を検出するための試験紙

—GOD, POD及びオートリジン（西ドイツ国特許公開第2415257号明細書、西ドイツ国特許公告第1121847号明細書、オーストリア国特許第198896号明細書）、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（西ドイツ国特許公開第2460903号明細書）、置換アミノカルバゾール（西ドイツ国特許公開第2205733号明細書、同第2338932号明細書）及

紙。

前記の試験法の殆んどを水溶液中で実施するので、水溶性沃素酸塩を使用すると有利である。分析法を妨害しない限り、沃素酸の無塩-及び有機カチオンとの水溶性塩すべてが実際に該当する。殊に、入手し易くかつ一部のものは市販されているアルカリ塩、更にアルカリ土類塩、アンモニウム塩又は単純アミン、例えばピペリジン、ピペラジン等の塩である。

特別な場合には常用の処方の変更が必要である：

—試験紙の工業的製造では時々比較的長時間の含浸が必要である、この長時間中に場合により含浸溶液中で既に指示薬の部分酸化が起り得る。例えばこれは西ドイツ国特許公開第2205733号明細書による置換アミノカルバゾールの場合に該当する。この場合には、初めに試験紙を他のすべての試薬で含浸させ、その後相応する沃素酸塩を他の処方成分を溶解しない有機溶剤から

びヘテロ環式アジン（西ドイツ国特許公開第1648840号明細書）を含有する、

尿中グルコース検出するための試験紙

—ガラクトースOD, POD及びオートリジン（米国特許第3362886号明細書）を含有する、尿中ガラクトースを検出するための試験紙

—特異性オキシダーゼ, POD及びオートリジン（米国特許第3099605号明細書）を含有する、分散性基質の試験紙

—GOD, POD, オートリジン（西ドイツ国特許公開第1598153号明細書）及び3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（西ドイツ国特許公開第2460903号明細書）を含有する、血中グルコースを測定するための試験フィルム

—テトラソリウム塩及びシアホラーゼ（例えば西ドイツ国特許公開第2452283号明細書）を含有する、NADH又はNADH形成基質もしくは酵素を測定するための試験

紙。後含浸させることによりある程度試薬を空間的に分離させると有利である。例えば有機可溶性沃素酸塩は第四沃素酸アンモニウム並びに沃素酸と長鎖状アミンとの塩である。

—沃素酸塩を使用することにより試験法の安定性の問題が生じる場合には、一般に公知である安定性を改良する手段、例えば場合により好適な分離剤、例えば重合体の添加下に種々の溶剤から順次に含浸させることにより行なうことができる。

迅速診断剤中での沃素酸塩の使用は次のpH範囲でだけ有利である：

—pH値約4.5以内では沃素酸塩のアスコルビン酸による還元では遊離沃素が次第に増加する量で生成し、これは既に記載したように多くの指示薬を酸化する。更に、沃素酸塩は酸性媒体中で酸化電位+1.20V(コックトン・ウィルキンソン、前記参照)を有するので殆んど指示薬及び他の処方成分

とは認容性ではない。

—pH 7～8を上廻るとアスコルビン酸の沃素酸塩による酸化は不活発になり、従つて有効な妨害阻止のためには極めて多量の沃素酸塩が必要であり、これは加工処理の困難及び場合によつては安定性の問題を惹起し得る。

沃素酸塩を被検液中に存在するアスコルビン酸量に対して2～20倍のモル過剰量で使用するると有利である。実際に、アスコルビン酸の酸化は本来の検出反応の前に行なわなければならない分で、迅速に進行する検出反応には徐々に進行する場合よりも大過剰量の沃素酸塩が必要である。既に記載したようにアスコルビン酸の酸化は高いpHでは緩慢になるのでこの場合にも大過剰で使用するべきである。いずれにせよ正確な量の沃素酸塩は簡単な連続試験により容易に測定することができる。

本発明による迅速診断剤は妨害を受けないかもしくは妨害の少ない公知の迅速診断剤に比べ

て次の利点を有する：

- その取扱いは従来の、部分的には長い間常用の迅速診断剤のものと完全に一致する。
- その製造は簡単であり、通常の製造法に殆んど一致する。
- アスコルビン酸オキシダーゼを含有する迅速診断剤と比べて、部分的にはより高い妨害阻止率を有し、殊に著しく廉価に製造することができる。

沃素酸塩の使用は迅速診断剤中への配合に限定されるものではない。つまり例えば沃素酸塩を直接被検溶液に添加することができ、それにより妨害的な反応成分を除去した溶液を公知方法で測光法により又は常用の迅速試験により更に試験することができる。勿論、基質又は試薬が沃素酸塩と反応するような溶液試験法では実施し得ないことを注意すべきである。

それは例えば複合試験法で尿試験する際に亜硝酸塩及び胆汁色素(ウロビリノーゲン及びビリルビン)に関する試験である。これらの物質

は試験紙の酸化媒体中でその検出前に沃素酸塩により酸化される。更に、通常の亜硝酸塩試験に使用される芳香族アミンは褐色の化合物に酸化される。

特定の試験が沃素酸塩の添加により妨害されるか否かは標準を沃素酸塩を添加してかつ添加しないで比較することにより簡単に追試することができる。

或る特定の場、例えばpH 5～6で行なう、アスコルビン酸が非常に迅速に沃素酸塩により酸化される分析法では、沃素酸塩を試薬調剤に又はその一部に添加して分析の経過を著しく簡略化すると有利である。他の場合、例えば、血清の分析では沃素酸塩を常用の弱酸性脱蛋白剤、例えば酢酸ウラニルに添加することができ、それにより著しく妨害阻止された試験溶液が得られる。次いで、緩衝液又は緩衝液を添加された試薬系の添加により試験溶液を検出反応に好適なpH値、例えば7～9にすることができる。

殊に本診断剤は、試薬系を試験系に不溶の吸

収性担体に含浸するもしくは場合により硬質担体、例えばプラスチックシート上に固定された試験系で膨潤性のフィルム中に配合した迅速試験である。その後、試験系により湿潤した後で変色が起ることによって反応が認められる。

診断剤に試験系で可溶性であつてもよくかつ例えば溶液、凍結乾燥体又は試験錠剤として存在するもしくは試験系において可溶性でありかつ硬質の担体上又は担体中に存在するフィルム中に配合されていてよい。その後、試薬を試験系並びに場合により他の溶剤と混合しかつ反応をキュベット中で測光法により測定する。

試験系とは場合により好適な溶剤の添加下に検査すべき試料である。試薬系とは反応する物質とすべての他の助剤、例えば緩衝液、湿潤剤、粘度調節剤、安定剤、対比染色剤並びに場合により溶剤等との全体を表わす。

次の実施例により本発明を詳説するがこれに限定されるものではない。

例1

尿中の血液(赤血球)を検出する試験紙

濾紙(Schleicher & Schüll No. 23 SL)を連続的に次の溶液で含浸し、かつ40℃で乾燥させる:

溶液 1

1.2 モル-クエン酸塩緩衝液 (pH 5.25)	35.0 ml
エチレンジアミンテトラ酢酸, 二ナトリウム塩	0.1 g
ジオクチルナトリウムスレホスクシネート	0.5 g
2,5-ジメチルヘキサン-2,5ジヒドロペル オキシド(約70%)	1.6 g
リン酸トリモルホリド	12.7 g
沃素酸ナトリウム	0.5 g
エタノール	30.0 ml
蒸留水	全量 100.0 ml

溶液 2

3,3',5,5'-テトラメチルベン ジジン	0.3 g
フエナントリジン	0.2 g
1-フェニルセミカルバジド	0.02 g

溶液 1

グルコースオキシダーゼ(71 U/mg)	1.2 g
ペルオキシダーゼ(66 U/mg)	0.2 g
1.2 モル-クエン酸塩緩衝液(pH 5)	50.0 ml
9-(2-ジメチルアミノプロピル)-6-クロル-	
3-アミノカルバゾールジヒドロクロリド	2.1 g
テトラジン	0.12 g
ラウロールサルコシン	1.1 g
蒸留水	全量 100.0 ml

溶液 2

沃素酸テトラメチルアンモニウム	1.4 g
エタノール	全量 100.0 ml

同じようにして溶液 1 だけで含浸した試験紙を製造する。

グルコース 100, 300 及び 1000 mg/dl を含有する尿を調節し、その中にそれぞれアスコルビン酸 0, 50, 100 及び 200 mg/dl を秤量装入する。

試験紙を浸漬し、かつ吸収性ベース上に置く。浸漬して1分後にその反応量色を比較する。そ

トルエン/メタノール(60:40) 全量 100.0 ml

この試験紙を用いて 5 個/ml の存在をアスコルビン酸 150 ~ 200 mg/dl の存在においても検出することができる。沃素酸塩の代りにアスコルビン酸オキシダーゼ 3・10⁴U を含有する同じ試験紙では陽性反応はアスコルビン酸 30 ~ 50 mg/dl の濃度までであり、添加物を含まない濾紙では僅かに約 10 mg/dl のアスコルビン酸までで確認することができる。本発明による試験紙を3日間60℃に加熱する場合にそれはその感度を維持する。アスコルビン酸オキシダーゼを含有する試験紙はこの負荷を与えた後で添加物を含まない紙と同じように反応する。

例 2

尿中のグルコースを半定量的に測定するため

の試験紙

濾紙(Schleicher & Schüll 597 NF-Ind)を連続的に次の組成の溶液で含浸し、かつその温度 50℃で乾燥させる。

の際にアスコルビン酸を含有しない尿の反応量色を内部標準として選択した。次の表から、アスコルビン酸による妨害が沃素酸塩の添加により除去されることが明らかである。

グルコース mg/dl による表示

沃素酸塩	0	50	100	200(アスコルビン酸 mg/dl)
-	100	陰性	陰性	陰性
+	100	100	100	100
-	300	100	陰性	陰性
+	300	300	300	300
-	1000	300	100	陰性
+	1000	1000	1000	1000

例 3

尿中グルコースの検出用試験紙

濾紙(Schleicher & Schüll 597 NF)を次の組成の溶液で含浸し、かつ50℃で乾燥させる:

グルコースオキシダーゼ(71 U/ml)	0.38 g
ペルオキシダーゼ(66 U/ml)	0.02 g
沃素酸カリウム	2.00 g
タルトラジン	0.08 g

〇ートリジン 0.42g
 エタノール 33.0ml
 蒸留水 全量100.0ml
 この試験紙を用いると、アスコルビン酸0、50、100及び200mg/dlを秤量添加したグルコース50mg/dlを含有する尿は実質的に同じ緑色の反応を呈する。

沃素酸塩を含まない同じ試験紙はアスコルビン酸を含まない尿中でのみ陽性反応を行なう。

例4

血中又は血清中の低いグルコース含量を測定するための試験フィルム

成分

ポリビニルアセテートプロピオネート分散液
 (Propislan 70D) 45.0g
 0.5モルリン酸塩緩衝液(pH5.5)
 中のアルギン酸ナトリウムの1.85%溶液 35.0g
 水5.0ml中に溶解したナトリウムノニルサルフェート 0.75g

例5

NADHの検出用試験紙

伊紙(Schleicher & Schüll ~~4-4111~~ 23SL)を次の組成の溶液で含浸しかつ50℃で乾燥させる：

ヨードニトロトリフェニルテトラゾリウム
 クロリド 0.2g
 沃素酸ナトリウム 0.5g
 ノニルフェノールポリグリコールエーテル 0.2g
 ジアホラーゼ(32U/mg) 0.05g
 0.15モルリン酸塩緩衝液(pH7) 40.0ml
 蒸留水 全量100.0ml

同様にして沃素酸塩を含まない試験紙を製造した。

両方の紙はNADHの水溶液と反応して赤色を呈色する。NADH溶液にアスコルビン酸を加えると沃素酸塩を含まない紙は強く反応する。

例6

血清中のグルコースの測定

溶液

脱蛋白溶液1：

グルコースオキシダーゼ(71U/mg) 0.2g

水10ml中に溶解した

ペルオキシダーゼ(66U/mg) 0.25g

アセト~~ン~~5ml中に溶解した3,3',5,5'-テトラメ 0.68g

チルベンジジン

沃素酸ナトリウム 1.0g

これらの成分を十分に混合し、層厚200μプラスチックシート製のベース上に塗布しかつ60℃で35分間乾燥させる。

同じ方法で沃素酸塩を含有しないフィルムを製造した。

グルコース20mg/dl及びアスコルビン酸0.25もしくは5.0mg/dlを含有すれ血清を滴下し、1分後にふき取りかつ更に2分後に線状の0~100-尺度の使用下に市販の反射光度計(Reflomat[®])で色を測定する：

血清

試験フィルム	0	2.5	5.0 (アスコルビン酸 mg/dl)
沃素酸塩を含まない	47	43	35
沃素酸塩を含有	46	45	45

0.9%食塩溶液中の酢酸ウラニル0.16%
 脱蛋白溶液2：

0.9%食塩溶液中の酢酸ウラニル0.16%及び沃素酸ナトリウム0.05%

試薬溶液：

POD0.8U/ml, OOD10U/ml, アジノービスーベンズチアゾスルホン酸NH₄-塩リン酸塩緩衝液(pH7)中1.0mg/ml(100ミリモル/L)

試料1：

グルコース100mg/dlを含有する血清

試料2：

グルコース100mg/dl及びアスコルビン酸20mg/dlを含有する血清

標準：

水100ml当りグルコース9.1ml

脱蛋白

次の規準(ml)によりピペット添加しかつ遠心分離する：

脱蛋白溶液 1	1.00	1.00	—	—
脱蛋白溶液 2	—	—	1.00	1.00
試料 1	0.10	—	0.10	—
試料 2	—	0.10	—	0.10
生じる上澄み液	1.1	1.2	2.1	2.2

分析

次の規準によりピペット添加し (ml)、2.5
 分で30分間恒温保持し、436nmで吸光度を
 測定する (d = 1 cm) :

蒸留水	0.1	—	—	—
標準	—	—	—	—
上澄み	—	0.1	—	—
試料溶液	5.0	—	5.0	—
E	0.115	0.425	0.424	0.366
E-E (空値)	—	0.310	0.309	0.251

結果

$C = 100 \cdot R(\text{試料}) / E(\text{標準})$ により計算

上澄み	1.1	1.2	2.1	2.2
試料中のアスコルビン酸	—	+	—	+
脱蛋白溶液中の沃素酸塩	—	—	+	+
結果 (mg/dl)	99.7	89.0	100.3	99.4

アスコルビン酸により起る試料 2 中の妨害は
 沃素酸塩により完全に除かれる。

例 7

L-グルタミン酸の測定

溶液

試薬溶液:

0.1 モル-リン酸カリウム/トリエタノールアミン-

緩衝液 (pH 8.6) 100 ml 中

トリトン (Triton) × 100 1.2 ml

ジアホラーゼ 30 U

NAD 10 mg

ヨード-ニトロ-トリフェニルテトラゾリウムクロリド 60 mg

試薬溶液 2:

水 100 ml 中のグルタメートデヒドロゲナ

—ゼ 900000 U

試料 1:

水 100 ml 中の L-グルタミン酸 100 mg

試料 2:

水 100 ml 中の L-グルタミン酸 100 mg

及びアスコルビン酸 40 mg

沃素酸塩溶液:

水 100 ml 中の沃素酸ナトリウム 200 mg

試料の用意

次の規準によりピペット添加し (ml) かつ室

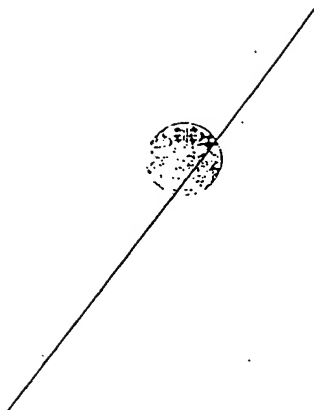
温で 15 分間希留させる:

試料 1	1.0	1.0	—	—
試料 2	—	—	1.0	1.0
NaIO ₃ -溶液	—	1.0	—	1.0
蒸留水	1.0	—	1.0	—
生成混合物液	1.1	1.2	2.1	2.2

分析

次の規準によりピペット添加し (ml)、2 分
 後に開始吸光度 E₁ を 492 nm (d = 1 cm) で測
 定し、試薬溶液 2 で開始し、15 分後に最終吸

光度 E_2 を測定する。



特開昭56-151358(9)

試薬溶液 1	1.1	1.2	2.1	2.2
蒸留水	1.0	1.0	1.0	1.0
混合物	1.8	1.8	1.8	1.8
E_1	0.2	0.2	0.2	0.2
試薬溶液 2	0.058	0.053	0.041	0.041
E_2	0.03	0.03	0.03	0.03
$E_2 - E_1 (\Delta E)$	0.490	0.499	0.503	0.503
$\Delta E - \Delta E (\text{空値})$	0.432	0.446	0.454	0.454
	0.428	0.442	0.452	0.452

結果

$C = 224 (\Delta E - \Delta E (\text{空値}))$ により計算

混合物液	1.1	1.2	2.1	2.2
試料中の	-	-	+	+
アスコルビン酸				
沃素酸塩処理	-	+	-	+
結果 (mg/dl)	95.9	99.0	読み取不可	1.0 1.2

正確な測定を阻害する、アスコルビン酸により起る吸光度の潜行（テトラゾリウム塩の緩慢な還元）は、沃素酸塩を含有する試料溶液の予備恒温保持により阻止することができ、その際に過剰の沃素酸塩は分析を妨害しない。

復代理人 井理士 矢野 敏雄

